

## B型肝炎ウイルスコア粒子の構造に関する研究

著者	小野寺 史朗
号	1534
発行年	1983
URL	<a href="http://hdl.handle.net/10097/19625">http://hdl.handle.net/10097/19625</a>

氏 名 (本籍) お の でら し ろう  
小 野 寺 史 朗

学 位 の 種 類                      医                      学                      博                      士

学 位 記 番 号                      医            第    1 5 3 4            号

学位授与年月日 昭和 58 年 9 月 14 日

学位授与の要件 学位規則第5条第2項該当

最 終 学 歴 昭和 5 1 年 3 月  
東北大学農学部卒業

学位論文題目 B型肝炎ウイルスコア粒子の構造に関する研究

(主 查)

論文審査委員 教授 山本 敏行 教授 岩崎 祐三

教授 山 根 績

## 論 文 内 容 要 旨

B型肝炎ウイルス (HBV) は直径 42 nm の球形粒子で、二層構造を有し、表面はエンベロープ (HBsAg 蛋白)、内部はヌクレオカプシド (コア粒子) からなっている。コア粒子はHBcAgの抗原性を有し、二本鎖 DNA 及び DNA ポリメラーゼ活性を内蔵することが知られている。著者らはHBcAg蛋白の免疫化学的、生化学的性状を研究しているが、これまでに感染性のマーカーとなるHBeAgがHBcAgの崩壊産物であることを見出し、さらにHBcAg蛋白 (コアペプチド) の二次構造に関してその特徴を明らかにしてきた。本研究においてはコア粒子の免疫化学的、生化学的性状と形態との関連を明らかにするためにコア粒子の微細構造の解析を試み、コア粒子カプシドの構築を検討した。コア粒子の分離精製は、亜急性B型肝炎患者剖検肝を出発材料とした。精製法は粒子形態の保存という観点からHBeAgを遊離させるCsCl密度勾配遠心法を用いず、ショ糖クッション遠心法、セファロース4Bによるゲルろ過法をくりかえして最終精製試料を得た。コア粒子の電顕観察はAlmeidaの発見以来数多く報告されたが、コア粒子表面はsubunitの入り組んだ複雑な構造を示すために、通常のnegative染色法による限りその微細構造を解析することは困難とされてきた。著者はこの問題を解決するために、Horneらが開発したnegative staining-carbon film法を適用し、精製コア粒子をin vitroで単層結晶化する方法をまず検討した。その結果、0.5mg/mlのコア粒子を等量(10  $\mu$ l)の3%モリブデン酸アンモン(pH6.5)と混合してマイカ面上に展開するという条件により、高頻度に結晶形成が認められた。光回折法により結晶配列の一部をフーリエ変換すると、hexagonalな回折点の配列が得られた。結晶中のコア粒子の輪郭は正20面体構造の反映と考えられるが、このことを確認するためにWilliamらの方法に準じてpt. pdによる二重シャドウイングを試みたところ、シャドウイングの方向に応じて影の形状に変化が認められ、正20面体構造を支持する結果となった。コア粒子の結晶配列をpositive染色するとDNA含有部分のみが直径21 nmのelectron denseなヌクレオイド様粒子として観察され、DNAはコア粒子内部に高度にパッキングされていることが判明した。さらにヌクレオイド内部にはウイルスDNA結合蛋白と考えられるelectron lucentな構造物の存在が示唆された。carbon film法の導入により、電顕像のコントラスト、解像度が改善されたことによってコア粒子の表面に直径4.0-4.2 nmのカプソマー構造の配列が認められた。粒子当りのカプソマー総数はそのサイズから約180個と算出された。また5回対称軸位置でのローテーションによる画像処理から、粒子周辺に放射状に配列する20個のsubunitの鮮明化がみられた。これはcomputerにより合成したT=3 (subunit総数180個)の正20面体構造を5回対称軸方向からみた像と一致する結果である。これらの結果より、カプソマーはsubunitの集合体ではなく、subunitそのも

の（コアペプチドのモノマー）であり，コア粒子のカプシドはこれら subunit が顕著な cluster を形成せずに，互いに等価の位置関係で  $T=3$  の正20面体構造を構築していると考えられた。次に，コア粒子カプシドの構築をさらに予測することを目的として，コア粒子を物理化学的処理により破壊した際にみられる抗原系の変化及び粒子形態の変化を検討した。その結果，i) コア粒子の崩壊は pH 4.5 以下で起る。ii) 高イオン強度緩衝液下では粒子の崩壊は起らないか，起ってもわずかである。iii) 疎水結合を切断する条件，例えば高濃度尿素処理により粒子崩壊が起る。ii) 及び iii) に関してさらに詳細に検討すると，高塩濃度（2.5 M CsCl，1 M NaCl）処理により，HBcAg 活性及び形態には変化は起らないが，カーボンサンドウィッチ膜法による観察では，1 M NaCl 処理コア粒子は直径が約 2 倍に拡大する。このことから，高塩濃度処理で subunit 間の結合が loose になることが明らかになった。1～8 M 尿素処理では 5 M 以上で急激に HBcAg 活性が低下し，同時に形態の崩壊が起る。崩壊産物のサイズは，8.5－12.5 nm であるが，7 M 以上ではこれらの崩壊粒子はさらにモノマーにまで分解する。これらの分解実験とコアペプチドの生化学的性状からコア粒子の構造モデルを提案した。このモデルでは，コアペプチドの N 端が粒子表面に，C 端が中心部に向けて存在している。各コアペプチド（subunit）は互いに疎水性の結合を示しており，これは NaCl，CsCl 処理では構造に変化を起さないが，尿素（5 M 以上）処理では容易に解離する。また positive 染色におけるヌクレオイド様部分はおそらくコアペプチドの C 端側の塩基性アミノ酸に富む  $\beta$ -turn 構造領域であり，DNA との結合部分である。

## 審 査 結 果 の 要 旨

B型肝炎ウイルス (HBV) は *in vitro* における培養系がないために、感染性を有するウイルス本体を大量に入手することが困難である。そのために HBV のウイルス学的性状に関しては不明の点が少なくない。

本研究は、亜急性 B 型肝炎患者剖検肝より HBV コア粒子 (HBV のヌクレオカプシド成分) を分離精製し、その微細構造の解析を試み、さらに種々の物理化学的処理により破壊した粒子の分解像から、カプシド構築を予想する実験を行なったものである。

著者は従来困難とされていたコア粒子の微細構造を解明するために、まずゲルろ過法等により形態を完全に保存した状態で高純度のコア粒子を精製し、これらの精製粒子を *in vitro* で単層結晶化する方法 (negative staining-carbon film 法) を検討した。その結果、予想した通りの二次元の結晶様配列を得ることに成功し、以後の構造解析を可能にした。

コア粒子はこれまで球状とも考えられていたが、結晶配列における粒子の輪郭及び二重シャドーイングによる影の形状から、正 20 面体構造を有することが証明された。粒子カプシドの構成単位として、直径約 4.0 nm のサブユニット構造が認められ、粒子当りのサブユニット総数は約 180 個と計算された。このことから、コア粒子のカプシドは形態学的に  $T=3$  の正 20 面体構造から成ると考えられるが、構成サブユニットはペンタマー・ヘキサマーの如く顕著な cluster を形成せずにカプシドを構築していることが示唆された。また positive 染色により、コア粒子はウイルス DNA を高度にパッキングしていることが明らかになり、さらに中心部には DNA 結合蛋白の存在が示唆された。

物理化学的処理によるコア粒子の分解実験の結果、特に尿素処理による stepwise の粒子崩壊が認められたが、塩処理によっては容易に形態変化を起こさないことから、サブユニット間の結合には疎水結合の関与が大きいことが示唆された。

以上、本研究は HBV コア粒子の構造に関して、正 20 面体であることを立証し、カプシドを構成するサブユニットの配列系 ( $T=3$ ) を明らかにし、さらにコア粒子の内部構造及び、サブユニット分子 (コアペプチド) 間の化学的結合に関して示唆を与えたものであり、HBV コア粒子の構造に関してウイルス形態学的に明確な知見を提供した点は充分評価し得るものとする。よって本論文は学位授与に値するものと認める。